

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY..

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Problem Image Mailbox.**



Docket No.: NHL-NP-43
Serial No.: 10/646,620

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

EXAMINER: (NOT YET RECEIVED)
ART UNIT: 1645
SERIAL NO.: 10/646,620
FILING DATE: August 22, 2003
INVENTORS: Burghardt WITTIG, Christoph STEIN, Michael
SCHÄFER, Matthias SCHROFF, Claas JUNGHANS,
and Sven Andres KÖNIG MEREDIZ
TITLE: LOCAL PAIN-COMBATING AGENT
Greensburg, Pennsylvania 15601

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

April 7, 2004

TRANSMITTAL LETTER

Sir:

Please find enclosed herewith the following documents relating to the above-cited case:

- 1) a certified copy of German Patent Application No. 101 09 092.7, filed on February 24, 2001;
- 2) a certified copy of International Patent Application No. PCT/DE02/00583, filed on February 19, 2002; and
- 3) a stamped, self-addressed postcard, return of which is requested to acknowledge receipt of the enclosed documents.

TRANSMITTAL LETTER
Page 2

It is believed that no fee is required to file the enclosed documents.

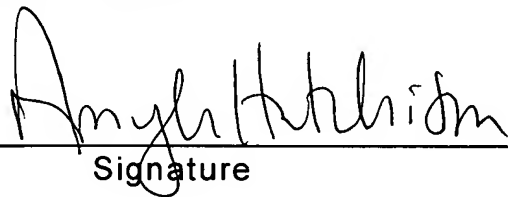
I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on April 7, 2004.

Respectfully submitted,



Nils H. Ljungman, Esq.
Attorney for the Applicant
Reg. No. 25,997
Nils H. Ljungman & Associates
P.O. Box 130
Greensburg, PA 15601-0130
Telephone:(724) 836-2305
Facsimile:(724) 836-2313

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on April 7, 2004.


Signature

Amy L. Hutchison
Name of person mailing paper or fee

April 7, 2004
Date

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 09 092.7

Anmeldetag: 24. Februar 2001

Anmelder/Inhaber: MOLOGEN Forschungs-, Entwicklungs- und Ver-
triebs GmbH, 14195 Berlin/DE

Bezeichnung: Mittel zur lokalen Schmerzbekämpfung

IPC: A 61 K 48/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 4. März 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wallner

MOLOGEN
Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH
Fabeckstr. 30
14195 Berlin

XI 197/01

Mittel zur lokalen Schmerzbekämpfung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Dämpfung der Schmerzempfindung, insbesondere bei akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen, durch Expression körpereigener neuroendokriner Peptide an der Entzündungsstelle.

Allgemeiner Hintergrund der Erfindung

- 5 Schmerz ist ein Signal des Körpers, das Krankheit oder Verletzung anzeigt. Als solches ist es, obwohl subjektiv als unangenehm empfunden, sinnvoll und wichtig. Wenn Schmerz chronisch wird, tritt seine Warnfunktion in den Hintergrund. Chronischer Schmerz ist ein medizinisch und sozio-ökonomisch schwerwiegendes Problem. In Deutschland allein leben 700.000 bis 800.000 Schmerzkranken, von
- 10 denen nur 10% adäquat behandelt werden können. Zu den wichtigsten Verursachern von Schmerzerkrankungen gehören die Gruppe der rheumatischen Erkrankungen, Krebsleiden sowie Schmerzen unklarer Ursache wie Rücken- und

Kopfschmerzleiden ohne feststellbare organische Ursache. Allein rheumatische Schmerzleiden verursachen in Deutschland jährlich Kosten von rund 30 Milliarden Mark. In den USA leiden zur Zeit ca. 40 Millionen Menschen an Arthritis, für 2020 ist eine Fallzahl von fast 60 Millionen geschätzt worden (J Managed Care Pharm 1999: 5 414-419).

Neben die Behandlung der den chronischen Schmerz verursachenden grundlegenden Leiden (welche in vielen Fällen an einem mangelnden Verständnis der pathogenen Mechanismen oder einem Fehlen an therapeutischen Interventionsmöglichkeiten scheitert) tritt die Notwendigkeit, den Schmerz 10 wirkungsvoll zu bekämpfen. Die beiden Substanzklassen, die hier vor allem eingesetzt werden, sind die der Opiate und der sog. nicht-steroidalen Entzündungshemmer (Nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs).

Beide Substanzklassen sind in ihrer Anwendung nicht unproblematisch, wegen des tatsächlichen oder subjektiv befürchteten Suchtpotentials, der möglichen 15 Atemdepression, Übelkeit und Sedierung (Opiate) oder der z.T. dramatischen Nebenwirkungen vor allem im gastrointestinalen Bereich (Ulcer, Blutungen (NSAIDs)). Zusätzlich zu den durch den chronischen Schmerz verursachten Beschwerden besteht für die mit NSAIDs behandelten Patienten eine erheblich erhöhte Wahrscheinlichkeit, an gastrointestinalen Beschwerden als Folge der 20 Therapie zu leiden.

Das Bedürfnis nach lokal (am Ort der Schmerzentstehung) wirksamen Mitteln ohne die genannten zentralnervösen oder gastrointestinalen Nebenwirkungen zur Schmerzbekämpfung ist mithin offensichtlich.

Wissenschaftliche Vorarbeiten

25 Seit ca. 1990 ist bekannt, dass Opioidrezeptoren in der Peripherie zur Schmerzdämpfung (Antinociception) in entzündetem Gewebe beitragen, und dass die wirksame Komponente der Antinociception körpereigenes β -Endorphin (β -END) ist (Stein et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87, 5935-5939 (1990)). Der Effekt ist im Modell der entzündeten Rattenpfote auf entzündetes Gewebe beschränkt (Stein et 30 al. J. Neuroscience 10, 1292-1298 (1990)). Das β -END wird im entzündeten

Gewebe von Lymphozyten produziert und freigesetzt (Cabot et al. J. Clin. Invest. 100, 142-148 (1997)).

Die lokale Freisetzung von Corticotropin-Releasing Factor (CRF) ist dabei Voraussetzung des schmerzdämpfenden Effektes des β -END, und für Interleukin-1 β konnte eine den antinociceptiven Effekt fördernde Funktion gezeigt werden (Schäfer et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91, 4219-4223; ibid. 93, 6096-6100 (1996)). Die antinociceptive Wirkung der Leukozyten bedarf der Einwanderung der β -END sezernierenden Zellen in das entzündete Gewebe (Machelska et al, Nature Medicine 4, 1425-1428 (1998)). Der Stand der Forschung ist referiert in Machelska und Stein, Current Opinion in Anaesthesiology 1999, 579-581.

Ishii et al. (Experimental Neurology 166, 90-98 (2000)) konnten zeigen, dass die Implantation von β -END produzierenden Tumorzelllinien in den Subarachnoidalraum zur Schmerzdämpfung im Tiermodell führt. Ähnliche Ergebnisse zeigen Wu et al. (Neural Transplant Plast 4, 15-26 (1993)). Es ist dabei zu bemerken, dass diese Untersuchungen nicht an Tieren mit akut entzündetem Gewebe durchgeführt wurden, und die Implantation von genetisch modifizierten Tumorzellen ins zentrale Nervensystem eine relativ grosse Ferne von in Menschen anwendbaren Problemlösungen erkennen lässt.

Feingold und Iadarola (Hum Gene Therapy 10(7):1251-7 (1999)) zeigten die antinociceptive Wirkung von β -END, welches von genetisch modifizierten Adenoviren sezerniert wird, die in den Subarachnoidalraum gespritzt wurden und die Meningen infizierten. Diese Methodik wurde von Iadarola et al. ebenfalls zum Patent angemeldet (WO 0016800 A2). Eine virale Methode des Gentransfers beschreiben Wilson et al. (Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3211-6 (1999); Brain Res 792, 133-5 (1998)), die Herpesviren als Genfähre in Gewebe des Zentralen Nervensystems einsetzen.

β -END ist ein 31 Aminosäuren langes Peptid. Es ist kodiert auf dem Exon 3 des Pro-Opiomelanocortingens (POMC) und wird als Teil eines Vorläuferpeptides gebildet, aus dem auch die Peptidhormone ACTH und gamma-Lipotropin erhalten werden. Die Transkriptlänge des POMC ist unterschiedlich für zentrale und periphere Gewebe (Grauerholz et al., Peptides 19, 939-948 (1998)).

Ausgehend von diesem Stand der Wissenschaft ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung eines Mittel zur Verminderung bzw. Unterdrückung der Schmerzempfindung zur Verfügung zu stellen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1.

- 5 Ein wesentlicher Aspekt der Erfindung besteht in der Unterdrückung von Schmerz durch die lokale Expression von neuroendokrinen Peptiden. Ein weiterer wesentlicher Aspekt der Erfindung besteht darin, geeignete Expressionskonstrukte zur lokalen Synthese von neuroendokrinen Peptiden, insbesondere β -Endorphin, dessen Vorläufer POMC sowie geeigneter Abwandlungen dieser Peptide, und
10 Corticotropin-releasing-factor zur Verfügung zu stellen.

Erfindungsgemäß ist daher ein Mittel zur Verminderung oder Unterdrückung der Schmerzempfindung vorgesehen, welches Expressionskonstrukte zur Expression von neuroendokrinen Peptiden oder funktionellen Teilen derselben enthält, wobei es sich insbesondere um β -Endorphin, dessen Vorläufer Pro-Opiomelanocortingens
15 (POMC) sowie geeigneter Abwandlungen dieser Peptide, und/oder den Corticotropin-releasing-factor (CRF) handelt.

Das Mittel enthält erfindungsgemäß ein Genkonstrukt, welches zumindest den immediate-early Promotor des Cytomegalievirus (CMV-Promoter), die DNA-Sequenz des Pro-Opiomelanocortingens (POMC) kodierend für β -Endorphin und
20 eine geeignete Polyadenylierungssequenz enthält.

Die Expression der POMC-Sequenz in Gewebe führt neben der für die Schmerzdämpfung erwünschten Synthese von β -END auch zur Synthese mindestens der Gewebshormone adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und beta-melanozytenstimulierendes Hormon (beta-MSH). Da nicht ausgeschlossen werden
25 kann, dass in der weiteren klinischen Entwicklung der hier beschriebenen Erfindung sich die Synthese dieser "Nebenprodukte" als nachteilhaft erweist, wurden alternative Expressionskassetten hergestellt, in denen die für ACTH und beta-MSH kodierenden Abschnitte deletiert oder durch β -END kodierende Abschnitte ersetzt wurden (Beispiele 1.3;1.4 und Abb. 4). Auch diese Expressionskassetten zeigen im
30 RIA die Synthese von β -END. (Abb. 2).

Ein entsprechendes Expressionskonstrukt für den Corticotropin-releasing-factor (CRF) ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

5 β -Endorphin kann durch Insertion der vollständigen Sequenz des POMC-Gens der Ratte (Seq.ID 3) zwischen den immediate-early Promotor des Cytomegalievirus (CMV-Promoter) und eine geeignete Polyadenylierungssequenz innerhalb eines Expressionsplasmides (Abb. 1) und nachfolgende Transfektion dieses Expressionsplasmides in Zellkulturzellen der Ratte oder des Menschen im Radioimmunoassay (RIA) nachgewiesen werden (Abb. 2). Eine zur Kontrolle hergestellte Expressionskassette, in der vor der das β -END kodierenden
10 Nukleinsäuresequenz ein Stop-Kodon eingeführt wurde, zeigt keine Expression von β -END im RIA (Abb. 3, rechter Balken).

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren zur Herstellung der Expressionskonstrukte. Dabei wurden die Plasmide pMOK und pNOK verwendet, welche die DNA-Sequenzen bzw. den Sequenzabschnitt für β -Endorphin (β -END) in
15 unterschiedlichen Variationen, nämlich mehrfach, enthält, aber auch die Sequenz für den Corticotropin-releasing-factor (CRF) enthielten. Das rPOMC ist ein Polyprotein, aus dem durch Abspaltung durch zelleigene Proteinasen die eigentlichen Peptidhormone (β -MSH, ACTH, β -Endorphin) herausgespalten werden. Durch Ersatz der Sequenzen von β -MSH und ACTH durch β -Endorphin erhofft man
20 sich eine höhere Expression des β -END und dadurch eine verstärkte Schmerzreduktion. Die mehrfache Nutzung des Sequenzabschnittes für β -Endorphin hat den Sinn, dass verstärkt β -Endorphin abgelesen und exprimiert wird.

Es wurden verschiedene Expressionskonstrukte aus dem Plasmid pMOK-POMC hergestellt. Die Einzelheiten der Herstellung sind in den der EP 0 941 318 B1 und
25 DE 198 26 758 offenbart. Im Einzelnen wurden Plasmid-DNA, linear-kovalent geschlossene unmodifizierte (sogenannte "MIDGE"-) Expressionskonstrukte sowie mit einem die Kernlokalisationssequenz (NLS) des large T-Antigens von SV40 enthaltenden Peptid modifizierte MIDGE-Konstrukte hergestellt (MIDGE-NLS) (Abb. 4). Diese Modifikation zeigt den überraschende Vorteil, dass derart modifizierte
30 Konstrukte die Transfektionseffizienz verstärken. Die NLS-Kopplung der minimalistischen Nukleinsäurekonstrukte führt zu einer deutlichen Erhöhung der Effizienz des Gen-Transfers und damit der Expression von β -END. Diese

Expressionssteigerung wird dadurch erreicht, dass an das zu exprimierende Gen Oligodesoxyribonukleotide ligiert werden, an die zuvor ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) kovalent gebunden wurde. Wie aus *in vitro*-Versuchen bekannt ist, kann diese aus dem Virus SV40 stammende Sequenz den Transport von DNA aus dem Cytosol der Zelle in den Zellkern verbessern und somit die Transkriptionsrate der DNA steigern (vgl. WO 00/37659).

Bereits die Injektion von Plasmiden, welche die Expressionskassette für POMC enthalten, in entzündete Rattenpfoten, führt zu einer deutlichen Abnahme des Schmerzempfindens bei den behandelten Tieren (siehe Abb. 3). Diese Wirkung ist durch Komplexierung der DNA durch Polyethylenimin (PEI) noch deutlich verstärkbar (Abb. 5). Durch Komplexierung der DNA mit positiv geladenen Makromolekülen wird die Aufnahme von DNA in die Zelle erleichtert, zum anderen wird eine Art Kerntransportfunktion angenommen (Chemin I. et al., J. Viral Hepat, Nov; 5 (6): 369-75, 1998).

Die Injektion von POMC-kodierendem MIDGE führt ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des Schmerzempfindens. Die Injektion von peptidmodifizierten Konstrukten (MIDGE-NLS) allerdings hat mit grossem Abstand die höchste Wirkung (Abb.6).

Folgerichtig wird auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Mittels, enthaltend die erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte als Arzneimittel, insbesondere als Vakzine beansprucht.

Die Erfindung weist insbesondere folgende Vorteile auf: Durch das erfindungsgemäße Mittel wird eine Behandlung von chronischen Schmerzleiden ermöglicht, bei der auf den Einsatz von Opiaten und der nicht-steroidalen Entzündungshemmern (Nonsteroidal antiinflammatories, NSAIDs) verzichtet werden kann. Die mit derartigen Mitteln auftretenden bekannten Nebenwirkungen wie Übelkeit, Atemdepression, Abhängigkeit und Suchtprobleme (bei Opiaten), Magengeschwüre etc. können mithin vermieden werden. Ferner weist das erfindungsgemäße Mittel den überraschende Vorteil auf, daß es länger anhaltend ist, nämlich im Bereich von Tagen als bei der Injektion von rekombinanten β -END (Wirkungsdauer im Bereich von Minuten).

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen beschrieben; die Erfindung wird anhand von Ausführungsbeispielen und den nachfolgenden Abbildungen näher beschrieben:

5 **Abb. 1** zeigt den funktionellen Aufbau der verwendeten Expressionsplasmide pMOK und pNOK sowie die klonierten rPOMC-Sequenzen. Die künstlichen Sequenzen rPOMC-1 β End, rPOMC-2 β End und rPOMC-3 β End wurden in das Plasmid pNOK kloniert, das einen einfachen CMV Promotor und kein Intron besitzt.

10 **Abb. 2** zeigt den Nachweis der Expression von β -END im Zelllysate von Rattenzellkulturen mittels eines Radioimmunoassays (RIA). Alle Expressionskonstrukte zeigten eine deutliche Expression von β END.

15 **Abb. 3** zeigt die lineare Korrelation zwischen der applizierten Menge des Plasmids pMOK-rPMOC und der Schmerzempfindungsschwelle der Versuchstiere. Als Plasmidinsert wurde die vollständige rPOMC Sequenz (Bsp: 1.1) benutzt und das Plasmid in verschiedenen Konzentrationen in die Entzündungsstelle injiziert. Zum Nachweis der schmerzlindernden Wirkung von β -END, wurde eine um die Sequenz von β -END verkürzte Expressionskassette (Bsp. 1.2) hergestellt. Erwartungsgemäß zeigt sich keine schmerzlindernde Wirkung im Versuch, siehe rechten äußeren Balken in Abb. 3.

20 **Abb. 4** zeigt die verschiedenen Expressionskassetten, die zur Herstellung der MIDGE Konstrukte verwendet wurden. Die erzeugten Konstrukte enthalten neben der kodierenden Sequenz lediglich die zu ihrer Expression notwendigen Promotor- und Terminationssequenzen. Die Kopplung mit den Peptiden zur nukleären Lokalisation (NLS-Sequenz) erfolgte wahlweise.

25 **Abb.5** zeigt die signifikante Verstärkung der Expression von β -END durch Komplexierung der DNA mit PEI bei Plasmid.

Abb.6 zeigt den Vergleich der antinociceptiven Wirkung der eingesetzten Expressionkonstrukte Plasmid, MIDGE und MIDGE mit NLS gekoppelt (MIDGE-NLS). Dabei zeigt sich MIDGE-NLS als mit großem Abstand effektivstes Expressionssystem.

Abb.7 zeigt die antinociceptive Wirkung der peptidmodifizierten MIDGES in Abhängigkeit von der Zeit. Ein signifikanter Effekt der Schmerzlinderung ist selbst nach 96 Stunden bei applizierten Konzentrationen von MIDGE-rPOMC-NLS von 50 und 125 µg zu sehen.

5 Ausführungsbeispiele

Beispiel 1.1: Klonierung von rPOMC der Ratte

RNA wurde aus Rattenhirn-Zellen isoliert und mit Hilfe der reversen Transkriptase mit universellen Primern in DNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern für die cDNA des POMC (linker Primer: 5'-
10 AATTATGGTACCATGCCGAGATTCTGCTACAG; rechter Primer: 5'-
TTCTCAGAGCTCTCACTGGCCCTTCTTGTGCACGTTCTTGATG) wurde eine PCR durchgeführt. Das entstandene PCR-Produkt erwarteter Länge wurde aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen KpnI und SacI verdaut und in den Vektor pMOK kloniert. Klone wurden mit Restriktionsverdauen analysiert und Klone
15 richtiger Fragmentlängen durch Sequenzierung bestätigt. Die Wildtyp-Sequenz ist in Seq.ID 3 (rPOMC-WT) wiedergegeben.

Beispiel 1.2: Klonierung von rPOMC-β-END

Als Templat für die Klonierung des POMC-β-END diente das Plasmid pMOK-rPOMC. Durch PCR wurde ein Fragment amplifiziert, das im Vergleich zur POMC
20 Sequenz um die kodierende Sequenz für das β-END verkürzt war. Das Stop-Codon für die neu entstandene verkürzte Sequenz wurde durch die PCR neu eingeführt (das Stop-Codon ist im rechten Primer fett markiert). Folgende Primer wurden in der PCR verwendet:

linker Primer:
25 5'-AATTATGGTACCATGCCGAGATTCTGCTACAG
rechter Primer:
5'-ATTATGAGCTCTCAGCGCTTGTCTTGGGCGGGTTG

Nach Aufreinigen des PCR-Produktes und Restriktionsverdau mit KpnI und SacI wurde das Fragment in den Vektor pMOK kloniert. Klone wurden mit

Restriktionsverdauen analysiert und Klone richtiger Fragmentlängen durch Sequenzierung bestätigt. Die Sequenz ist in Seq.ID 4 (rPOMC- β -END) wiedergegeben.

Beispiel 1.3: Klonierung von rPOMC 1x β -END

- 5 Als Template für die Klonierung des POMC 1x β END diene das Plasmid pMOK-rPOMC. Das künstliche Genkonstrukt setzt sich zusammen aus den Nukleotiden der POMC-Sequenz bis zum letzten Codon vor dem Start der ACTH-Sequenz und der β -END-Sequenz. Zum Zusammensetzen der Gensequenz waren zwei PCR-Reaktionen nötig. Folgende Primer wurden verwendet:

10 Fragment 1:

linker Primer:

5'-AATTATGGTACCATGCCGAGATTCTGCTACAG

rechter Primer:

5'-ATTATTGAGCTCTAGAAGACATGCGCTTGCCCTCCCGTGGA

15 Fragment 2:

linker Primer:

5'-AATTATGGTCTCTGCGCTACGGCGGCTTCATGACCTC

rechter Primer:

5'-AATTATGAGCTCTGAAGACATGCGCTTCTGGCCCTTCTTGTGCACGTTC

- 20 Nach Amplifikation des ersten Fragmentes mit PCR und anschließender Aufreinigung wurde das Fragment mit KpnI und SacI geschnitten und in den Vektor pMOK kloniert. Richtige Klone wurden mit Restriktionsverdauen gefunden und mit Sequenzierung bestätigt. Das resultierende Plasmid wurde mit BbsI und SacI geschnitten. Fragment 2 wurde nach Aufreinigung mit Eco31I und SacI geschnitten.
- 25 Die Überhänge, die von BbsI und Eco31I generiert wurden, sind komplementär zueinander. Das Fragment 2 wurde in den Vektor mit Fragment 1 kloniert und richtige Klone mit Restriktionsverdauen gefunden und mit Sequenzierung bestätigt. Die Sequenz ist in Seq.ID 1 (rPOMC 1x β -END) wiedergegeben.

Beispiel 1.4: Klonierung von rPOMC 3x β -END

- 30 Als Template für die Klonierung des POMC 3x β -END diene ebenfalls das rPOMC. Im Vergleich zu Beispiel 1.3 musste ein weiteres Fragment durch Amplifikation mit

PCR hergestellt werden (Fragment 3). Im Unterschied zu Fragment 2 aus Beispiel 1.3 enthielt die Sequenz des Fragmentes 3 kein Stopcodon am Ende der β -END-Sequenz. Das Zwischenprodukt und das Fragment 2 aus Beispiel 1.3 konnten hier verwendet werden. Folgende Primer wurden für die Amplifikation von Fragment 3 verwendet:

linker Primer:

5'-AATTATGGTCTCTGCGCTACGGCGGCTTCATGACCTC

rechter Primer:

5'-TTCTCAGAGCTCTCACTGGCCCTTCTTGTGCACGTTCTTGATG.

- 10 Nach Aufreinigung wurde das Fragment 3 mit Eco31I und SacI geschnitten und in das mit BbsI und SacI geschnittene Zwischenprodukt kloniert. Das entstandene Zwischenprodukt 2 wurde ebenfalls mit BbsI und SacI geschnitten und ein weiteres Mal wurde das Fragment 3 in das Zwischenprodukt 2 kloniert. Zwischenprodukt 3 wurde noch einmal mit BbsI und SacI geschnitten und das Fragment 2 aus Beispiel
- 15 1.3 wurde als letztes Fragment (dieses Fragment enthält das Stop-Codon) in das Zwischenprodukt 3 kloniert. Das entstandene Plasmid enthielt 3 β -END Sequenzen hintereinander. Die Sequenz ist in Seq.ID 2 (rPOMC 3x β -END) wiedergegeben.

Beispiel 1.5: Klonierung von rPOMC-CRF

- RNA aus Rattenhirn-Zellen wurde isoliert und mit Hilfe der reversen Transkriptase
- 20 mit universellen Primern wurde die RNA in DNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern für die cDNA des Corticotropin-releasing-factor ((CRF); linker Primer: 5'-TTAATAGGTACCATGCGGCTGCGGCTGCTG; rechter Primer: 5'-ATTATGAGCTCTCATTTCCCGATAATCTCCATC) wurde eine PCR durchgeführt. Das entstandene PCR-Produkt erwarteter Länge wurde aufgereinigt, mit den
- 25 Restriktionsenzymen KpnI und SacI verdaut und in den Vektor pMOK kloniert. Klone wurden mit Restriktionsverdauen analysiert und Klone richtiger Fragmentlängen durch Sequenzierung bestätigt. Die Sequenz ist in Seq.ID 6 (rPOMC-CRF) wiedergegeben.

Beispiel 1.6: Herstellung von MIDGE-rPOMC mit und ohne NLS

MIDGES sind lineare, kovalent geschlossene Expressionskassetten, die lediglich aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer Polyadenylierungssequenz bestehen (vgl. EP 0 941 318 B1). Die Konstrukte wurden wie folgt erhalten: das unter Beispiel 1.1 beschriebene Plasmid pMOK-rPOMC wurde mit Eco 31I vollständig verdaut. Die Ligation mit 5' phosphorylierten haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotiden (ODN) 5'-AGGGGTCCAG-TTTTCTGGAC-3' durch T4 DNA Ligase in Anwesenheit von Eco 31I wurde durch Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Das resultierende Gemisch wurde konzentriert und mit Eco 31I und T7 DNA Ligase in Abwesenheit von Deoxyribonukleotid-Triphosphaten behandelt. Die Aufreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie.

MIDGES mit NLS Kopplung wurden wie folgt konstruiert: das NLS Peptid PKKKRKVEDPYC wurde in zwei Schritten an die ODN's gekoppelt. Zuerst wurde das modifizierte Oligonukleotid 5'-PH-d(GGGAGTCCAGT xT TTCTGGAC, wobei xT steht für aminomodifizierte Thyminbase mit C₂ – Aminolinker) (0,1mM) mit sulfo-KMUS (5mM) in PBS bei Raumtemperatur (RT) aktiviert. Nach 120 min. wurde die Reaktion mit 50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane gestoppt und das aktivierte ODN nach Ethanolpräzipitation (300mM NaOAc pH 5.2, 5.5 mM MgCl₂, 70 % Ethanol), Zentrifugation und einmaligem Waschen mit 70% Ethanol erhalten. Das so erhaltene ODN (0,1mM) wurde in PBS gelöst und reagierte mit dem Peptid (0,2mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Gelelektrophorese (3%) und Ethidiumbromidfärbung überprüft. Das entstandene NLS gekoppelte ODN wurde durch HPLC aufgereinigt und zur Synthese der MIDGE-POMC-NLS Konstrukte wie zuvor beschrieben verwendet.

Beispiel 2.1: Schmerzdämpfung nach Injektion von Expressionskonstrukten für rPOMC

50, 100, 250 und 350 µg pMOK-rPOMC wurden in 150mM Natriumphosphat pH 7,2 in einem Volumen von 200 µl in eine entzündete Rattenpfote injiziert. 24 h später wurde die Schmerzdämpfung in der entzündeten Rattenpfote untersucht. Die dabei verwendete Methode des „paw pressure threshold“ ist u.a. in Schaefer et al., Proc. Nat. Acad. Sci USA 914219-4223 (1994) auf Seite 4220 im Methodenteil beschrieben. Abb. 3 zeigt die Ergebnisse des Versuches. Pro Gruppe wurden 6 Ratten verwendet.

Patentansprüche

- 5 1. Mittel zur Verminderung oder Unterdrückung der Schmerzempfindung, enthaltend Expressionskonstrukte zur Expression von neuroendokrinen Peptiden oder funktionellen Teilen derselben.
- 10 2. Mittel nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem neuroendokrinen Peptid um β -Endorphin, dessen Vorläufer Pro-Opiomelanocortingens (POMC) sowie geeigneter Abwandlungen dieser Peptide, und/oder Corticotropin-releasing-factor (CRF) handelt.
- 15 3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, wobei dieses ein Expressionskonstrukt enthält, welches zumindest den immediate-early Promotor des Cytomegalievirus (CMV-Promoter), die DNA-Sequenz des Pro-Opiomelanocortingens (POMC) kodierend für β -Endorphin und eine geeignete Polyadenylierungssequenz enthält.
- 20 4. Mittel nach Anspruch 3, wobei aus der POMC-Sequenz die kodierenden Abschnitte für die Gewebshormone adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und/oder beta-melanozytenstimulierendes Hormon (beta-MSH) deletiert wurden.
- 25 5. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, wobei dieses ein Expressionskonstrukt enthält, welches zumindest den immediate-early Promotor des Cytomegalievirus (CMV-Promoter), die DNA-Sequenz des und eine geeignete Polyadenylierungssequenz enthält.
6. Mittel nach einem oder mehreren der Ansprüche 3 bis 5, wobei es sich bei dem Expressionskonstrukt um Plasmid-DNA handelt.
7. Mittel nach einem oder mehreren der Ansprüche 3 bis 5, wobei es sich um ein linear-kovalent geschlossenes Expressionskonstrukt handelt.

8. Mittel nach Anspruch 7, wobei das linear-kovalent geschlossene Expressionskonstrukt mit einem die Kernlokalisationssequenz (NLS) des large T-Antigens von SV40 enthaltenden Peptid modifiziert ist.
- 5 9. Mittel nach Anspruch 8, wobei das NLS-Peptid die Aminosäuresequenz PKKKRKVEDPYC aufweist.
- 10 10. Mittel nach einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 9, wobei die DNA durch Polyethylenimin (PEI) komplexiert ist.
11. Vektor zur Herstellung eines Expressionskonstruktes enthaltend die um den Sequenzabschnitt für β -Endorphin (β -END) verkürzte Desoxyribonukleinsäuresequenz des Pro-Opiomelanocortingens (POMC) (rPOMC- β -END: Seq.ID 4).
- 15 12. Vektor zur Herstellung eines Expressionskonstruktes enthaltend die um die Sequenzabschnitte für ACTH und beta-MSH verkürzte Desoxyribonukleinsäuresequenz des Pro-Opiomelanocortingens (POMC), enthaltend eine einfache β -Endorphin (β -END)-Sequenz (rPOMC 1x β -END:Seq.ID 1).
- 20 13. Vektor zur Herstellung eines Expressionskonstruktes enthaltend die Desoxyribonukleinsäuresequenz des Pro-Opiomelanocortingens (POMC) mit drei hintereinander angeordneten für β -Endorphin (β -END) kodierenden Sequenzabschnitten (rPOMC 3x β -END: Seq.ID 2).
14. Vektor zur Herstellung eines Expressionskonstruktes enthaltend die Desoxyribonukleinsäuresequenz kodierend für Corticotropin-releasing-factor (CRF) (POMC-CRF: Seq.ID 6).
- 25 15. Vektor nach Anspruch 11 bis 14, wobei der besagte Vektor das Plasmid pMOC oder auch pNOK ist.

16. Verwendung des Mittels nach einem oder mehrere der Ansprüche 1 bis 10 als Arzneimittel in der Schmerzbehandlung bei höheren Tieren und/oder Menschen.
17. Verwendung des Mittels nach Anspruch 16 als Vakzine.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Dämpfung der Schmerzempfindung, insbesondere bei chronischen entzündlichen Erkrankungen, durch Expression körpereigener neuroendokriner Peptide an der Entzündungsstelle. Insbesondere

5 betrifft die Erfindung die Expression von POMC oder CRF von lokal injizierten DNA-Expressionskonstrukten, vorzugsweise kovalent peptidmodifizierten Expressionskonstrukten.

Abb. 1

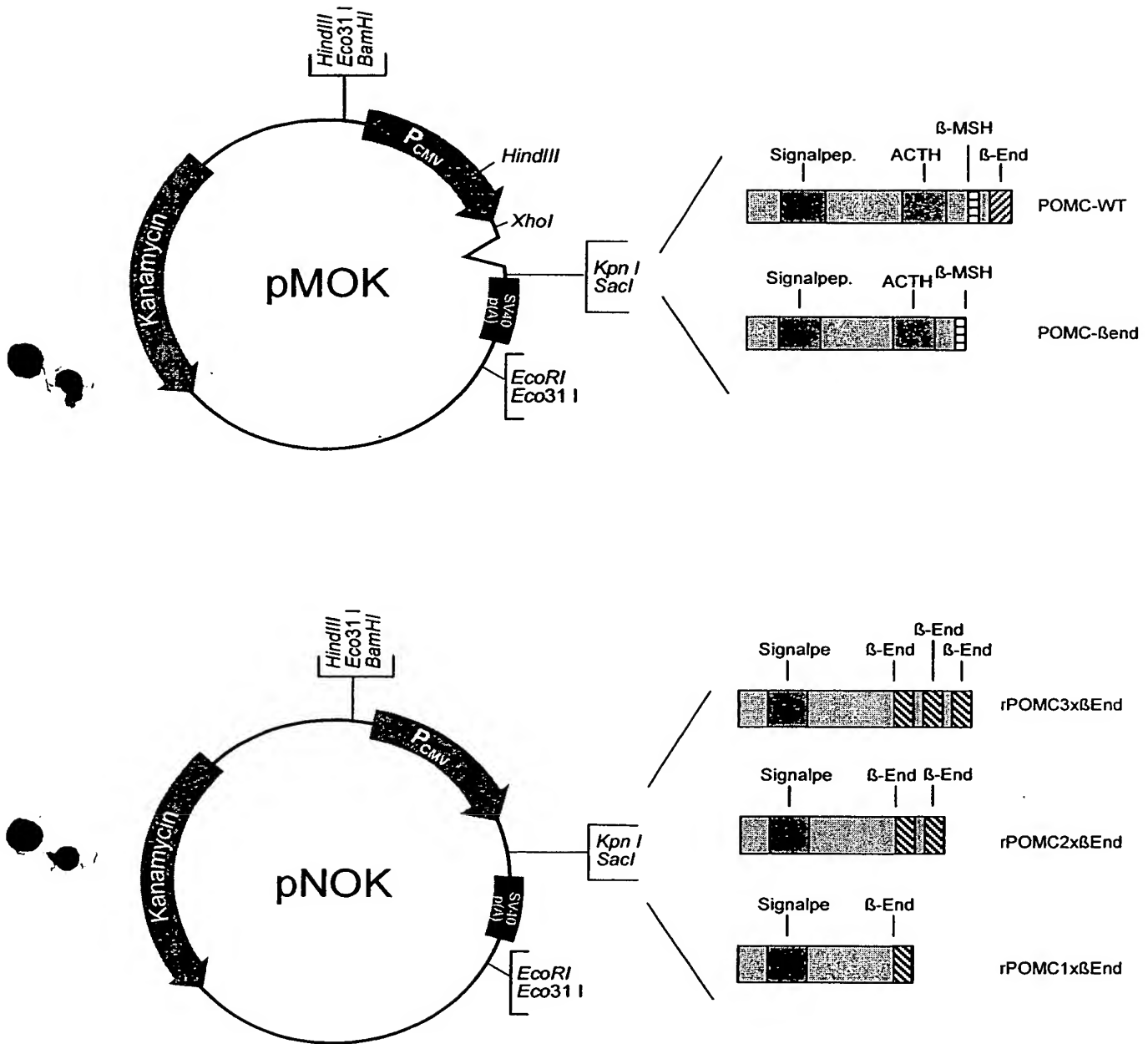
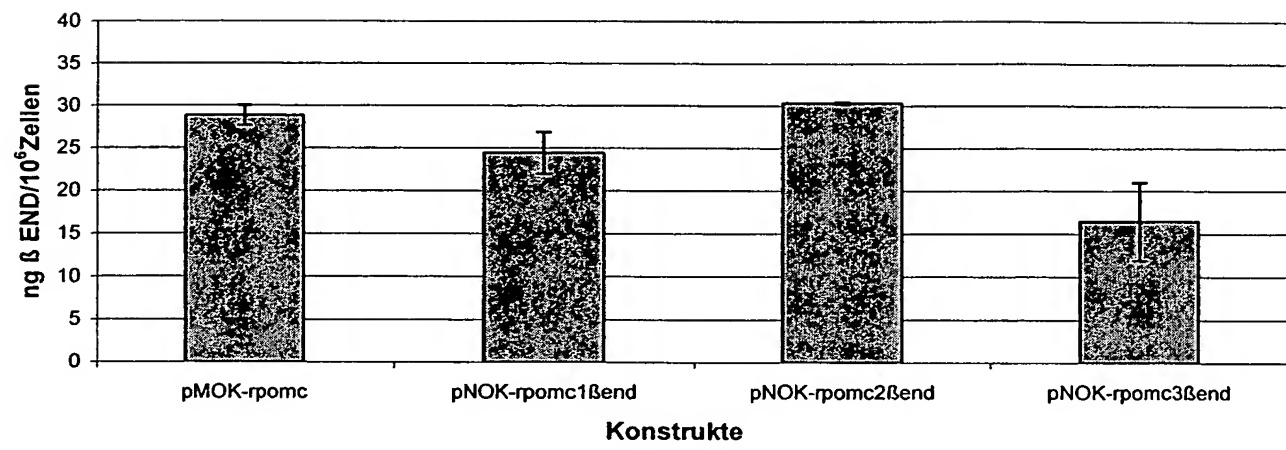


Abb. 2 RIA für β END im Zelllysate



**Abb. 3 Schmerzdämpfung nach Injektion von
Expressionskonstrukten für β -END**

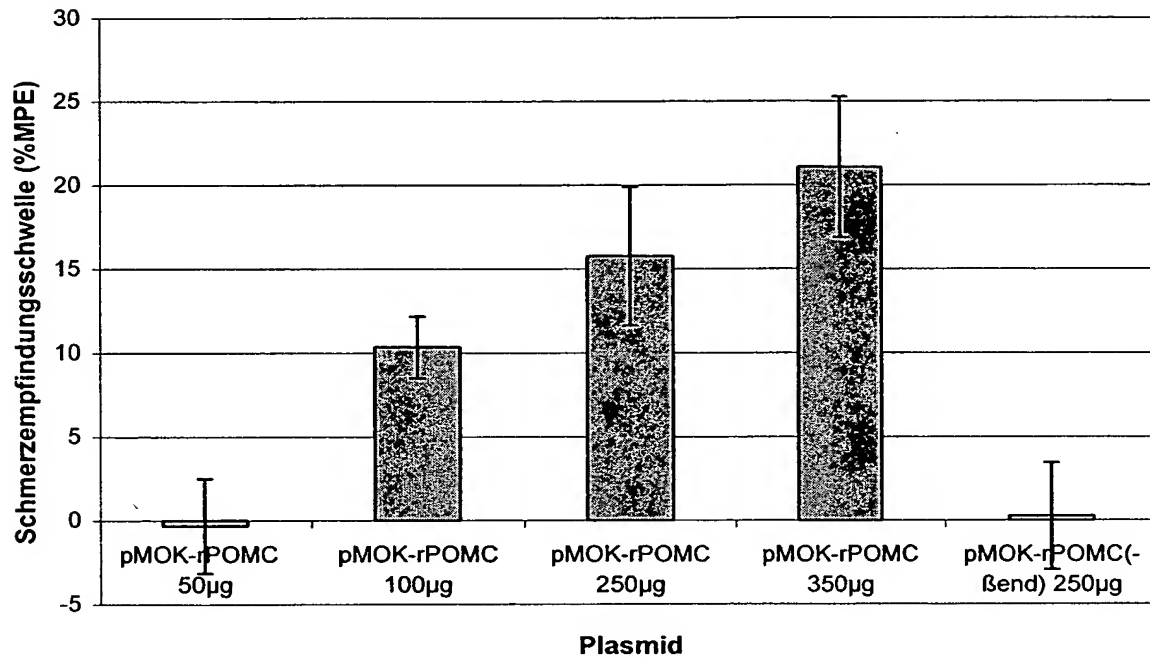


Abb.. 4

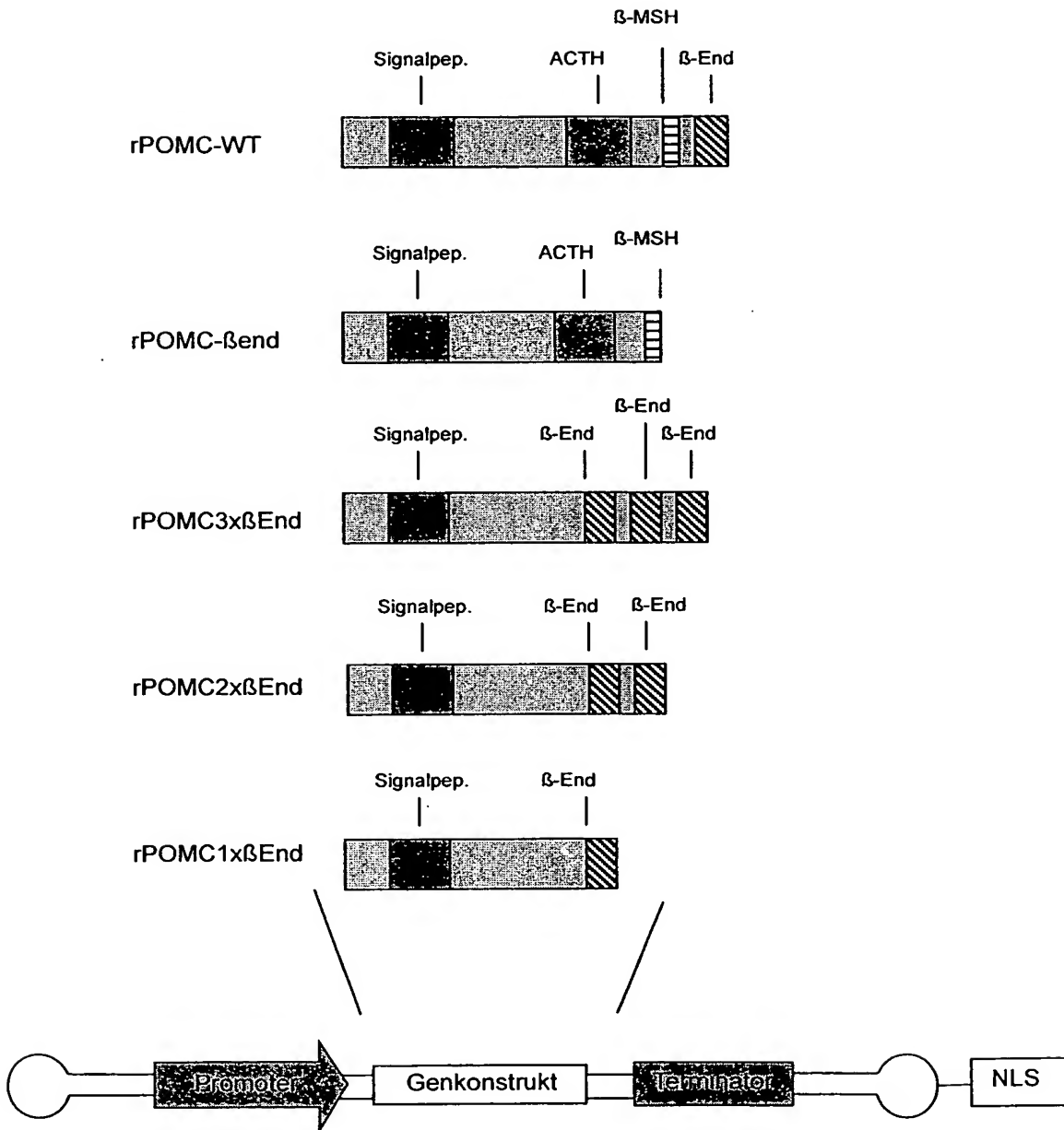


Abb. 5 Vergleich der verstärkenden Wirkung von PEI bei Plasmid

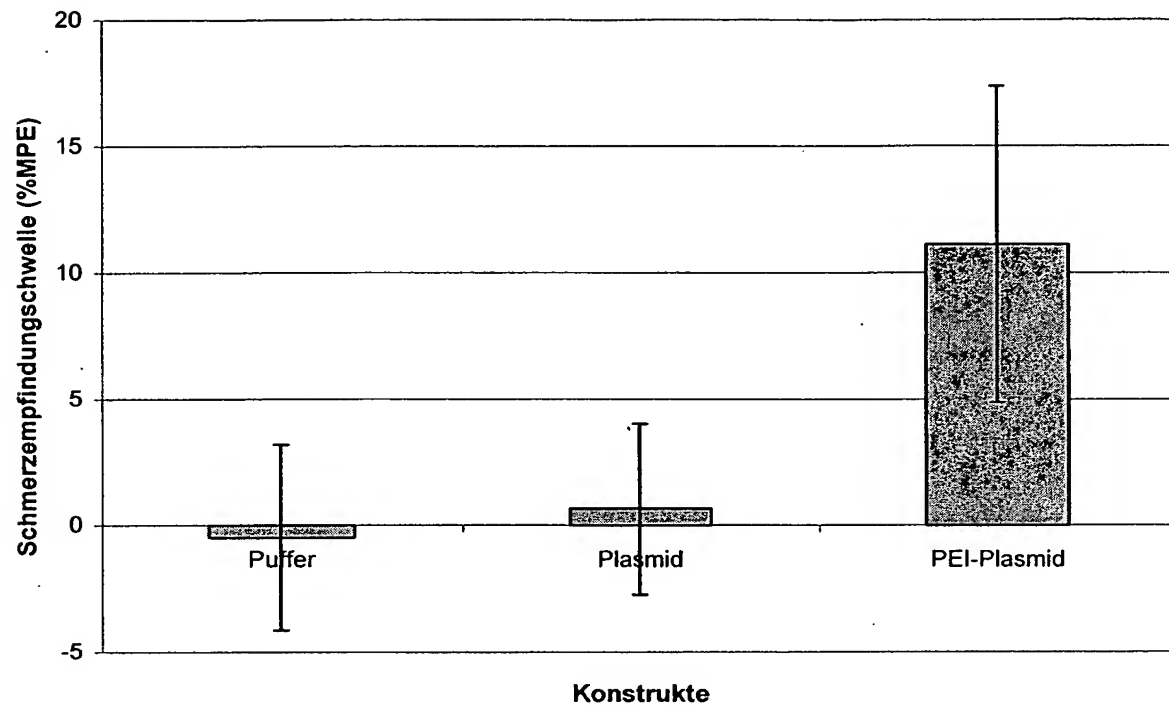


Abb. 6 Vergleich der antinociceptiven Wirkung von Plasmid, MIDGE und MIDGE-NLS

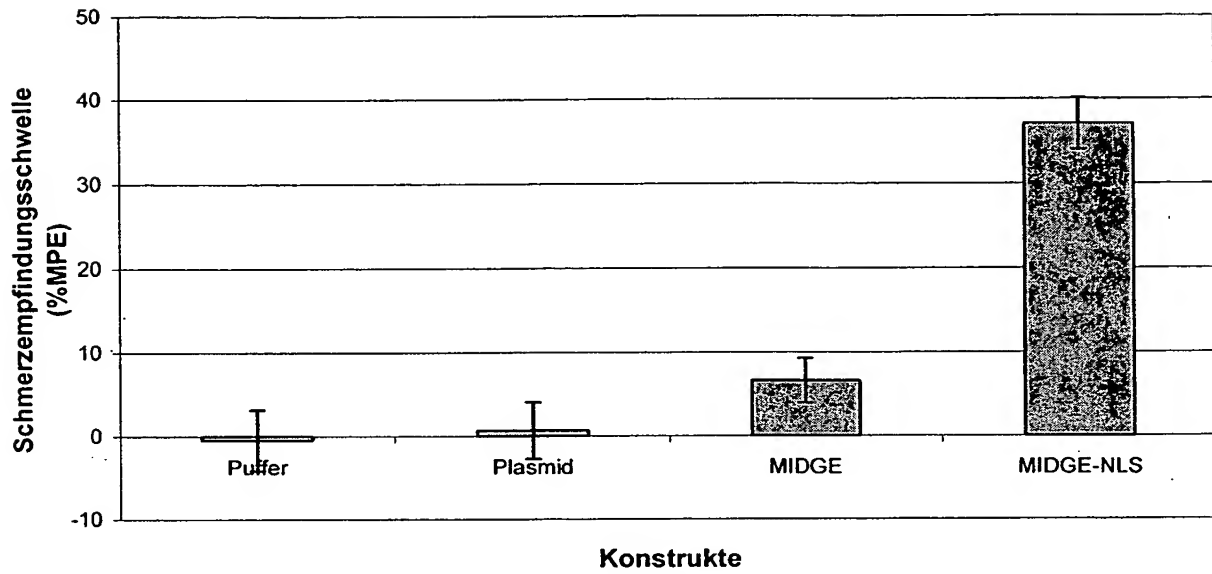
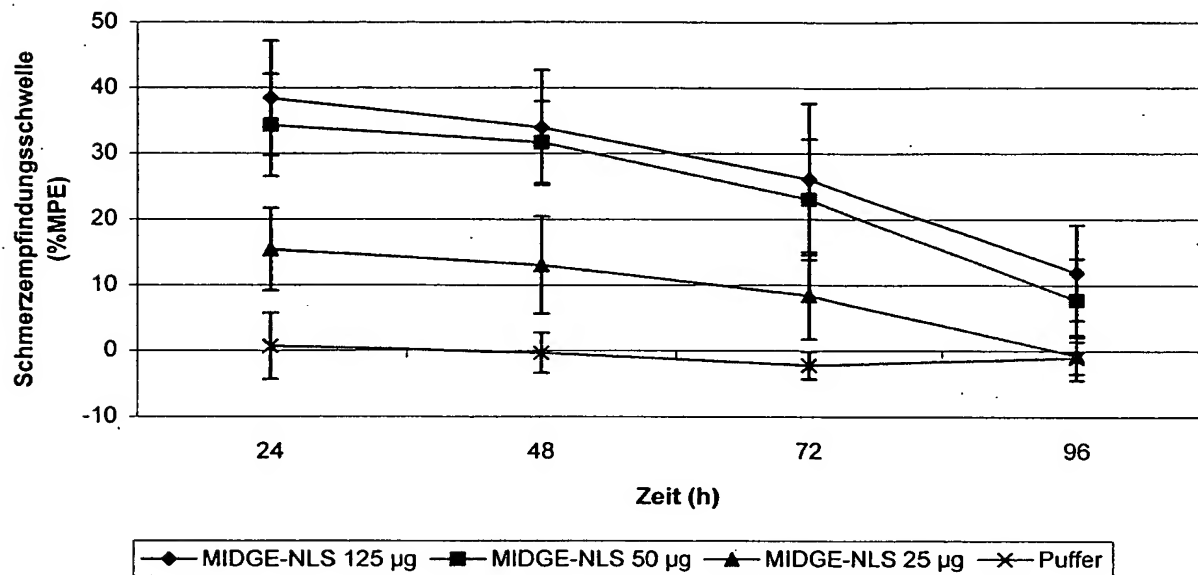


Abb. 7 Antinociceptive Wirkung von MIDGE-rPOMC-NLS als Funktion der Zeit



SEQUENZPROTOKOLL

<110> MOLOGEN Forschungs-, Entwicklungs- und vertriebs G

<120> Mittel zur lokalen Schmerzbehandlung

<130> XI 197/01

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 535

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

rPOMC-1x β -END

<400> 1

```
atgaacttgg agacaggcag cgggggctca gagttcggca tgagcgcagt gagctgcggc 60
aatgggaaac atgccgagat tctgctacag tcgctcaggg gccctgctgc tggccctcct 120
gcttcagacc tccatagacg tgtggagctg gtgcctggag agcagccagt gccaggacct 180
caccacggaa agcaacctgc tggcttgcac cggggcctgc agactcgacc tctcggcgga 240
gacgcccgtg tttccaggca acggagatga acagcccttg actgaaaatc cccggaagta 300
cgtcatgggt cacttccgct gggaccgctt cggcccagaga aacagcagca gtgctggcgg 360
ctcagcgtag aggcgtgcgg aggaagagac ggcgggggga gatggccgtc cggagccaag 420
tccacgggag ggcaagcgt acggcggtt catgacctcc gagaagagcc agacgccctt 480
ggtgacgctc ttcaagaacg ccatcatcaa gaacgtgcac aagaagggcc agtga 535
```

<210> 2

<211> 663

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

rPOMC-3x β -END

<400> 2

```
atgccgagat tctgctacag tcgctcaggg gccctgctgc tggccctcct gcttcagacc 60
tccatagacg tgtggagctg gtgcctggag agcagccagt gccaggacct caccacggaa 120
agcaacctgc tggcttgcac cggggcctgc agactcgacc tctcggcgga gacgcccgtg 180
```

```

tttccaggca acggagatga acagcccttg actgaaaatc cccggaagta cgtcatgggt 240
cacttccgct gggaccgctt cggcccgaga aacagcagca gtgctggcgg ctcagcgag 300
aggcgtgcgg aggaagagac ggcgggggga gatggccgtc cggagccaag tccacgggag 360
ggcaagcgct acggcggtt catgacctcc gagaagagcc agacgccctt ggtgacgctc 420
ttcaagaacg ccatcatcaa gaacgtgcac aagaagggcc agaagcgcta cggcggttc 480
atgacctcg agaagagcca gacgccctg gtgacgctct tcaagaacgc catcatcaag 540
aacgtgcaca agaagggcc gaagcgctac ggcggcttca tgacctcga gaagagccag 600
acgccctgg tgacgctctt caagaacgcc atcatcaaga acgtgcacaa gaagggccag 660
tga 663

```

<210> 3

<211> 708

<212> DNA

<213> RAT rPOMC-WT

<400> 3

```

atgccgagat tctgctacag tcgctcaggg gccctgctgc tggccctcct gcttcagacc 60
tccatagacg tgtggagctg gtgcctggag agcagccagt gccaggacct caccacggaa 120
agcaacctgc tggcttgcat ccgggcctgc agactcgacc tctcggcgga gacgcccggtg 180
tttccaggca acggagatga acagcccttg actgaaaatc cccggaagta cgtcatgggt 240
cacttccgct gggaccgctt cggcccgaga aacagcagca gtgctggcgg ctcagcgag 300
aggcgtgcgg aggaagagac ggcgggggga gatggccgtc cggagccaag tccacgggag 360
ggcaagcgct cctactccat ggagcacttc cgctggggca agccggtggg caagaagcgg 420
cgccctgtga aggtgtaccc caatgtcgcc gagaacgagt cggccgaggc ctttccccta 480
gagttcaaga gggagctgga aggcgagcag cctgatggct tggagcacgt cctggagccg 540
gataccgaga aggccgacgg gccctatcgg gtggagcact tccgctgggg caaccgcccc 600
aaggacaagc gctacggcgg cttcatgacc tccgagaaga gccagacgcc cctggtgacg 660
ctcttcaaga acgcatcat caagaacgtg cacaagaagg gccagtga 708

```

<210> 4

<211> 615

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: rPOMC-β-END

<400> 4

```

atgccgagat tctgctacag tcgctcaggg gccctgctgc tggccctcct gcttcagacc 60
tccatagacg tgtggagctg gtgcctggag agcagccagt gccaggacct caccacggaa 120
agcaacctgc tggcttgcat ccgggcctgc agactcgacc tctcggcgga gacgcccggtg 180
tttccaggca acggagatga acagcccttg actgaaaatc cccggaagta cgtcatgggt 240
cacttccgct gggaccgctt cggcccgaga aacagcagca gtgctggcgg ctcagcgag 300
aggcgtgcgg aggaagagac ggcgggggga gatggccgtc cggagccaag tccacgggag 360
ggcaagcgct cctactccat ggagcacttc cgctggggca agccggtggg caagaagcgg 420
cgccctgtga aggtgtaccc caatgtcgcc gagaacgagt cggccgaggc ctttccccta 480
gagttcaaga gggagctgga aggcgagcag cctgatggct tggagcacgt cctggagccg 540
gataccgaga aggccgacgg gccctatcgg gtggagcact tccgctgggg caaccgcccc 600

```

aaggacaagc gctga

615

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Kernlokalisationssequenz (NLS) des large Antigens
von SV40

<400> 5

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Tyr Cys

1

5

10

<210> 6

<211> 1195

<212> DNA

<213> RAT rPOMC-CRF

<400> 6

aaactcagag cccaagtacg ttgagaaact gaagagaaaag gggaaaggca aagaaaagga 60
gaagagaaaag gagaagagga agaaaacctg caggaggcat cctgagagag gtacctcgca 120
gaacaacagt gcgggctcac ctgccaaggg aggagaagag agcgccccta aacatgcggc 180
tgcggtgct ggtgtccgcg ggcâtgctgc tggtagctct gtcgccctgt ctgccttgca 240
gggccctgct gagcagggga tccgtctctg gagcgccgcg ggccccgcag ccgttgaatt 300
tcttgcaacc ggagcagccc cagcaacctc agccgattct gatccgcatg ggtgaagaat 360
acttcctccg cctggggaac ctcaacagaa gtcccgtgct tcggctgtcc cccaactcca 420
cgccccctcac cgcgggctcg ggcagccgcc cctcgcacga ccaggctgcg gctaactttt 480
tccgcgtgtt gctgcagcag ctgcagatgc ctgagcgccc gctcgacagc agcacggagc 540
tggcggaacg cggcgccgag gatgccctcg gtggccacca gggggcgctg gagagggaga 600
ggcggtccga ggagccgccc atctctctgg atctcacctt ccaccttctg agggaagtct 660
tggaatggc cagggcagag cagttagctc agcaagctca cagcaacagg aaactgatgg 720
agattatcgg gaaatgaaat gttgcgcttg gccaaaacga ttctgcattt agcacacaag 780
taaaaataaa aaatttaaaa cacagtattc tgtaccatac tgcagctctg atatcatttg 840
tttattttta tatagcttga agcatagaag atgtacaggg agagagccta tatacccctt 900
aattagcatg cacaaagtgt gtttctttgt agtaacaaaa cagcgttatt tgtattgttc 960
acgcttagtt tctatgtgca aataagtgtc tttatagcga tatcttaaag aaaatgtgga 1020
tccaaggagg aaacctttta aaaagcagat ggaagtcacc cagttgtttt tatttgga 1080
cacagtgtaa gagaattcat tcttgagggg tggctaggac aaaatgtgta agctctttga 1140
atcaactttt tcttgtaaat gtttcaataa taaaacatct ttctgacct tggtc 1195